DOI:10.11931/guihaia.gxzw202401062

澳洲坚果果仁 *MiMYB44L* 基因克隆与结构功能分析

许 鹏，谭秋锦，宋海云，郑树芳，杨小州，环秀菊，
张 涛，周春衡，韦媛荣，王文林*
（广西南亚热带农业科学研究所，广西 龙州 532400）

摘 要：澳洲坚果（*Macadamia integrifolia*）是一种高经济价值的常绿坚果树，其果仁富含脂肪酸和蛋白等营养成分。为鉴定澳洲坚果果仁中与营养成分形成相关基因，该研究采用转录组学、基因克隆、荧光定量和生物信息学等技术从澳洲坚果果仁营养成分含量显著差异品种'桂热 1 号'和'A4'的果仁转录组中挖掘调控基因。结果表明：（1）转录组分析发现'桂热 1 号'相比'A4'果仁中上调基因 1 667 个，下调基因 1 798 个，KEGG 富集分析发现差异基因主要在淀粉和糖代谢、氨基酸生物合成和碳代谢路径。（2）发现一个差异表达基因 gene-LOC122077931 编码 R2R3-MYB 转录因子 MYB44L，并采用 RACE 技术在'桂热 1 号'果仁中克隆了 *MiMYB44L*，其全长 1 165 bp，ORF 长度 999 bp，编码 332 个氨基酸。（3）采用生物信息学技术证明 MiMYB44L 含有 R2R3-MYB 家族特征的 SANT 结构域，不含有信号肽和跨膜结构域，含有磷酸化位点。（4）测定了 10 个澳洲坚果品种果仁中蛋白质含量，发现 *MiMYB44L* 在澳洲坚果高蛋白含量品种中表达显著高于其在低蛋白含量品种中的表达量，整体相关系数 0.54，达到极显著水平。该研究结果为深入解析 *MiMYB44L* 在澳洲坚果营养成分形成中的调控作用机制提供理论指导。

关键词：澳洲坚果，MiMYB44L，果仁，结构，表达分析
中图分类号：Q943　　　　　　　　　　　**文献标识码**：A

Cloning, structural and function analysis of *MiMYB44L* gene in kernels of *Macadamia integrifolia*

XU Peng, TAN Qiujin, SONG Haiyun, ZHENG Shufang, YANG Xiaozhou, HUAN Xiuju, ZHANG Tao, ZHOU Chunheng, WEI Yuanrong, WANG Wenlin*
（*Guangxi South Subtropical Agricultural Science Research Institute*, Longzhou 532400, Guangxi, China）

Abstract: Macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) is an evergreen nut tree with high economic value. Its kernel is rich in nutrients such as fatty acid and protein, etc. In order to further explore the main regulatory genes related to nutrient formation in *M. integrifolia* kernels, transcriptomics, gene cloning, fluorescence quantification PCR and bioinformatics techniques were used to screen potential regulatory genes from the kernel transcriptomes of 'Guire No. 1' and 'A4', which have significantly different nutrient content in *M. integrifolia* kernels. The results were as follows: (1) Transcriptome analysis showed that 1 667 genes were up-regulated and 1 798 genes down-regulated in 'Guire No. 1' kernel compared with those of 'A4' kernel and KEGG enrichment analysis showed that the differential genes were mainly in starch and glucose

基金项目：广西重点研发计划（桂科 AB22035012）；崇左市科技计划项目（崇科 20210710）；广西农科院基本科研业务费项目（桂农科 2023YM46）。

第一作者：许鹏（1988—），学士，农艺师，主要从事南亚热带果树新品种选育及高效栽培技术研究与推广工作，（E-mail）275327444@qq.com。
***通信作者**：王文林，硕士，研究员，主要从事澳洲坚果遗传育种和栽培技术研究等相关工作，（E-mail）22312595@qq.com。

metabolism, amino acid biosynthesis and carbon metabolism. (2) A significant differential gene-LOC122077931 encoding the R2R3-MYB transcription factor MYB44L was discovered. The *MiMYB44L* gene was cloned in kernels of *M. integrifolia* variety ‘Guire No. 1’ using RACE technology, which was 1 165 bp in length, 999 bp in ORF in length, and encoded 332 amino acids. (3) Bioinformatics analysis confirmed the presence of the SANT domain in the MiMYB44L protein, a hallmark feature of the R2R3-MYB family. The protein lacked both a signal peptide and a transmembrane domain but featured phosphorylation sites. (4) The protein content in kernels of 10 *M. integrifolia* varieties was determined. And it was found that the expression of *MiMYB44L* gene in *M. integrifolia* varieties with high protein content was significantly higher than that in varieties with low protein content, and the overall correlation coefficient was 0.54, reaching a very significant level. The results of this study provide theoretical guidance for in-depth analysis of the regulatory mechanism of *MiMYB44L* gene in the formation of protein content in *M. integrifolia*.
Key words: *Macadamia integrifolia*, MiMYB44L, kernel, structure, expression analysis

澳洲坚果（*Macadamia integrifolia*）是一种高经济价值的常绿坚果树，原产于澳大利亚东海岸的热带雨林。因其优质的可食用性，在世界各地的热带和亚热带无霜区进行商业种植（Yang et al., 2023）。澳洲坚果果仁的主要成分是脂肪、蛋白和多种微量元素等（Wojdylo et al., 2022）。前期研究表明，澳洲坚果果仁的营养成分含量在不同澳洲坚果种质之间变化较大，果仁内的变异系数由高到低依次为Ca＞Zn＞P＞Mg＞可溶性糖＞Fe＞蛋白质＞氨基酸＞K＞脂肪（谭秋锦等，2021a）。主成分分析可将主要营养成分聚为4个，氨基酸组分因子、矿物质因子、脂肪因子、蛋白质因子，累积贡献率为87.91%。可见，蛋白组分在澳洲坚果果实营养成分中具有重要作用。然而，在澳洲坚果研究中，对脂肪酸（Richards et al., 2020）和微量元素营养的研究较多（De Silva et al., 2023），但对蛋白含量及其调控的研究较少。蛋白质作为重要的生命大分子，除了提供营养价值外，还作为转录因子（Zumajo-Cardona et al., 2023）、酶（Gabrielli et al., 2022）、蛋白复合体（Gisriel et al., 2022）参与植物生长发育和抗逆等多种生物过程。

其中，R2R3-MYB转录因子MYB44参与逆境抗性和多种植物激素传导调控，是植物激素信号交互的关键转录因子（Wang et al., 2023）。在拟南芥基因组中，AtMYB44属于第22亚组，保守基序为22.1 （TGLYMSPxSP）和22.2 （GxFMxVVQEMIxxEVRSYM）（Stracke et al., 2001），通过与PYL9、WRKY70等蛋白结合从而调控拟南芥等植物的抗逆反应、参与乙烯和茉莉酸等激素信号传导过程，其自身亦受转录和翻译后调节。例如，AtMYB44提高拟南芥对桃蚜的抗性是通过激活乙烯信号途径EIN2实现的。MYB44竞争性抑制MYB340-bHLH2-NAC56复合体形成进而调控紫瓤甘薯花青素的生物合成。AtMYB44启动子区域核小体密度低，便于多种信号的转录因子调控其表达。在调控其他蛋白的相关研究中，发现牡丹PsMYB44通过抑制二氢黄酮醇-4-还原酶基因表达负性调节花瓣斑点分布（Luan et al., 2023）。来自中国野生紫葡萄的VaMYB44转录因子负调控转基因拟南芥和葡萄植株的耐寒性（Zhang et al., 2022）。综上可知，MYB44转录因子可能参与澳洲坚果中果实营养成分含量的调控。本研究以广西壮族自治区重要经济果树澳洲坚果为研究对象，依托澳洲坚果高低果仁蛋白含量差异显著品种的转录组数据和澳洲坚果‘桂热1号’品种基因组数据（Xia et al., 2022），采用转录组学、基因克隆和生物信息学等方法，通过鉴定果仁中差异显著基因的结构与功能，拟探讨以下问题：（1）澳洲坚果果仁中与营养成分形成相关的主效调控基因是哪些种类；（2）基因具有哪些特异性的结构与功能；（3）不同澳洲坚果品种果仁蛋白含量积累与基因表达量的关系如何。本研究对MYB转录因子22亚家族成员MiMYB44L进行结构分析、表达分析以及表达量与蛋白含量之间的相关分析等，为深入开展澳洲坚果营养

成分的转录调控研究打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2021—2023年在广西壮族自治区农业科学院广西南亚热带农业科学研究所澳洲坚果种质资源圃进行。该地区是南亚热带季风气候，热量丰富，雨量充沛，日照充足。选取不同果仁蛋白含量显著差异的10个品种‘JW’‘SH’‘A16’‘桂热1号’‘B7’‘B4’‘皇家大果’‘B3’‘A38’和‘A4’果仁为材料测定蛋白含量并提取RNA。根据本单位自主研发的主推品种‘桂热1号’基因组数据、‘桂热1号’和‘A4’果仁转录组数据筛选和克隆*MiMYB44L*基因。

1.2 *MiMYB44L* 克隆与表达规律分析

基因克隆采用MiMYB44L-F1 5′-TCCGTTTCTCTCATCTTCTC-3′和MiMYB44L-R1 5′-GTCTGTCTTCCATCTTCAATC-3′这对引物进行克隆。荧光定量MiACTIN为内参基因和相应的荧光定量引物为MiMYB44L-QF 5′-AATCGCTCGTCTCCTCTC -3′和MiMYB44L-QR 5′-GGCTTGAACCACCTGAAC -3′； MiACTIN-QF 5′-TCTTCATTGCCTGCACTCCAGA-3′和MiACTIN-QR 5′-TTCCACCTGAATGCCGTCTAGC-3′。在美国Bio-rad（伯乐）公司CFX96荧光定量PCR仪中进行反应。反应程序参照宋海云等（2023）的方法，并使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法分析处理荧光定量数据（宋海云等，2023）。

1.3 澳洲坚果蛋白含量测定

蛋白质含量测试依据中华人民共和国国家标准《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》GB/T5009．5—2016中的凯氏定氮法进行测定（谭秋锦等，2021a）。

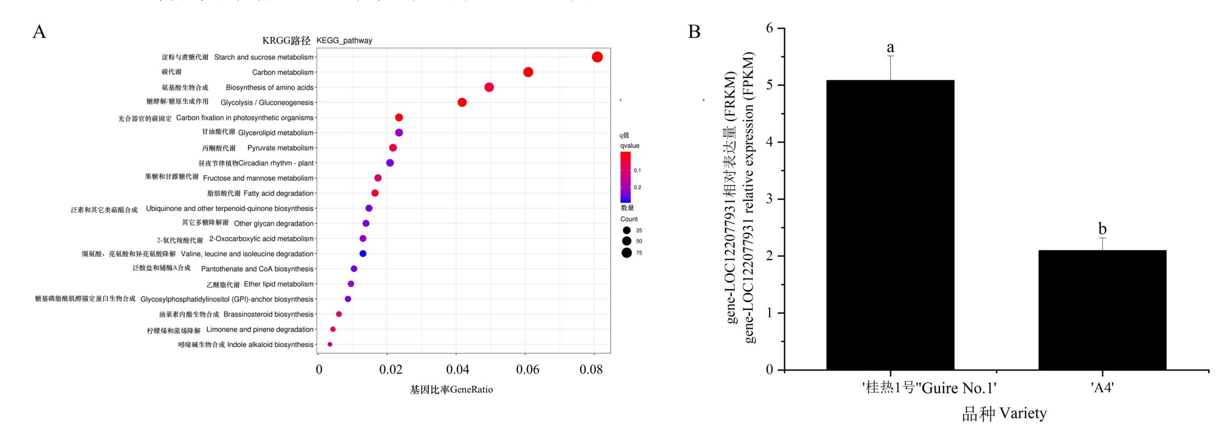
1.4 统计分析

采用Originpro 2021科技绘图软件和Office 365进行数据整理。所有基因表达实验数据均为3次生物重复和3次技术重复的平均值和标准误。采用SPSS 27版本对数据进行单因素方差分析、多重比较分析和相关分析（宋海云等，2023）。

2 结果与分析

2.1 澳洲坚果‘桂热1号’和‘A4’果仁转录组分析

采用北京百迈客生物科技有限公司（中国北京）的Illumina高通量测序平台对澳洲坚果高蛋白含量品种‘桂热1号’和低蛋白含量品种‘A4’果仁的转录组进行分析。共获得39.34 Gb Clean Data，各样品Clean Data均达到5.92 Gb，Q30碱基百分比在94.06%及以上。‘桂热1号’比‘A4’果仁上调基因1 667个，下调基因1 798个。进一步采用GO和KEGG富集分析发现差异基因主要在淀粉和糖代谢、氨基酸生物合成和碳代谢路径（图1：A）。随后发现一个差异基因gene-LOC122077931，编码R2R3-MYB转录因子MYB44L，在‘桂热1号’中表达量显著高于其在‘A4’果仁中的表达量（图1：B）。



A.‘桂热 1 号’和‘A4’果仁转录组 KEGG 分析；**B**. gene-LOC122077931 表达分析。

A. Transcriptome KEGG analysis in kernel of ‘Guire No. 1’ and ‘A4’; **B**. gene-LOC122077931 expression analysis.

图 1 ‘桂热 1 号’和‘A4’果仁转录组差异表达基因的 KEGG 富集分析和 gene-LOC122077931 基因表达分析

Fig. 1 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in kernel of ‘Guire No. 1’ and ‘A4’ and gene expression analysis of gene-LOC122077931

2.2 MiMYB44L 的生物信息学分析

根据澳洲坚果高蛋白含量品种‘桂热 1 号’和低蛋白含量品种‘A4’果仁的转录组分析结果，从中筛选到一个差异显著的 MYB 转录因子。进一步搜索‘桂热 1 号’基因组设计引物在澳洲坚果‘桂热 1 号’品种果仁中克隆了 *MiMYB*44*L* 基因。该基因核苷酸全长是 1 165 bp，cDNA 编码 ORF 长度 999 bp，编码 332 个氨基酸（图 2）。其编码蛋白分子量 36.3 kDa，等电点 8.19，分子式为 $C_{1572}H_{2486}N_{464}O_{500}S_{13}$，总原子数 5 035，不稳定系数 62.96，是不稳定蛋白。脂肪指数 67.26。亲水性值-0.636，为疏水性蛋白。

```
               10         20         30         40         50         60         70         80         90        100        110        120
1       ATGGCTTCTTCAAGGAAAGATATGGATCGGATCAAAGGACCGTGGAGCCCCGAGGAAGATGACTCGTTGCAGAAGCTTGTCCAGAAGCACGGCCCTAGGAATTGGTCCCTCATCAGCAAA
1        M  A  S  S  R  K  D  M  D  R  I  K  G  P  W  S  P  E  E  D  D  S  L  Q  K  L  V  Q  K  H  G  P  R  N  W  S  L  I  S  K

              130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230        240
121     TCCATCCCTGGGAGGTCTGGCAAGTCTTGTCGTCTCCGGTGGTGTAACCAGCTCTCTCCACAGGTGGAGCACAGAGCTTTTACGCCCGAAGAGGATGAGACGATCATCCGGGCGCACGCC
41       S  I  P  G  R  S  G  K  S  C  R  L  R  W  C  N  Q  L  S  P  Q  V  E  H  R  A  F  T  P  E  E  D  E  T  I  I  R  A  H  A

              250        260        270        280        290        300        310        320        330        340        350        360
241     AAGTTTGGTAATAAATGGGCCACAATCGCTCGTCTCCTCTCTGGTCGTACCGACAACGCGATCAAAAACCATTGGAATTCGACCCTCAAGCGCAAATGCTCGTCCATGGTCGATGACGCC
81       K  F  G  N  K  W  A  T  I  A  R  L  L  S  G  R  T  D  N  A  I  K  N  H  W  N  S  T  L  K  R  K  C  S  S  M  V  D  D  A

              370        380        390        400        410        420        430        440        450        460        470        480
361     AGCGACGATGCCCAAGCACACCAGCCGCTTAAGAGATCGAATAGTGCAGGCGCCGCAGTGGCTCCCGTCTCTTCGCTATATTTCAACAGCCCCAGCAGTCCCTCTGGATCCGATGTGAGT
121      S  D  D  A  Q  A  H  Q  P  L  K  R  S  N  S  A  G  A  A  V  A  P  V  S  S  L  Y  F  N  S  P  S  S  P  S  G  S  D  V  S

              490        500        510        520        530        540        550        560        570        580        590        600
481     GACTCCAGTCTGCCCGTGATGTCTTCTTCTCATGTGTACCGACCTGTACCAAGAACGGGAGGGATCTTACCGCCATCTCAGCATCAGCAGCAGCTAGAAACGTCGTCGTCGACGAACGAT
161      D  S  S  L  P  V  M  S  S  S  H  V  Y  R  P  V  P  R  T  G  G  I  L  P  P  S  Q  H  Q  Q  Q  L  E  T  S  S  S  T  N  D

              610        620        630        640        650        660        670        680        690        700        710        720
601     CCGCCTACCTCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTGGAGCAGATTCTTGCGAGGTTTCTAATCATGTTTCAGGGGGTTCAGGTGGTTCAAGCCATGAAACAACCCCTAACCAACTACCCACTCCC
201      P  P  T  S  L  C  L  S  L  P  G  A  D  S  C  E  V  S  N  H  V  S  G  G  S  G  G  S  S  H  E  T  T  P  N  Q  L  P  T  P

              730        740        750        760        770        780        790        800        810        820        830        840
721     GTGGCTGTGCCTACAGCCGTTCCGTTGCAACAGTTTCCGCCACCCCAGCAGCAGCTTAATCAACATATACAGTACAACGATTTCGGATCATCGGAGGTTCCTTATGCGGAGAAACATTTT
241      V  A  V  P  T  A  V  P  L  Q  Q  F  P  P  P  Q  Q  Q  L  N  Q  H  I  Q  Y  N  D  F  G  S  S  E  V  P  Y  A  E  K  H  F

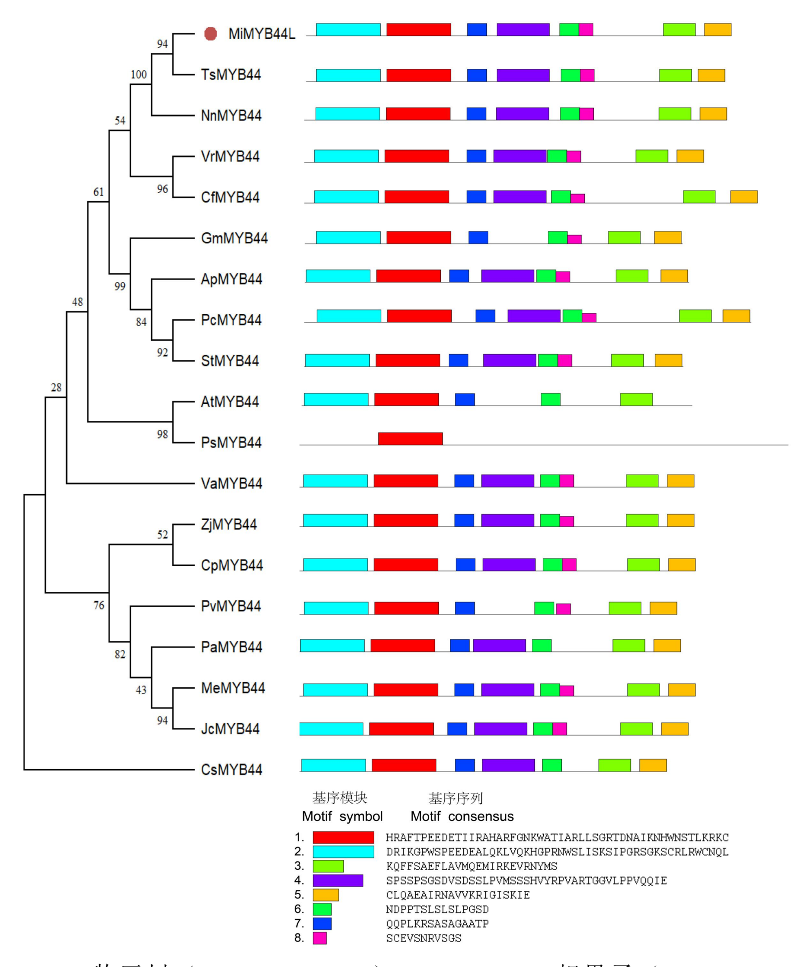
              850        860        870        880        890        900        910        920        930        940        950        960
841     ATCCCTTTCAGTCCTGGGTTCCTTTCTGTGATGCAAGAAATGATCAAAAAGGAAGTTAGGAATTACATGTCTGGGCTTGAGCAGAACGAGCTGTGTCTACAAGCTGAAGGGATTAGGAAC
281      I  P  F  S  P  G  F  L  S  V  M  Q  E  M  I  K  K  E  V  R  N  Y  M  S  G  L  E  Q  N  E  L  C  L  Q  A  E  G  I  R  N

              970        980        990
961     GTTGCTGTGAAGCGTATTGGCATCAGCAAGATCGATTAG
321      V  A  V  K  R  I  G  I  S  K  I  D  *
```

图 2　*MiMYB*44*L* 基因编码区核苷酸和氨基酸序列

Fig. 2　Coding region nucleotide and amino acid sequences of *MiMYB*44*L*

为进一步分析 MiMYB44L 蛋白的结构和特殊的基序，采用 NCBI 在线工具和 MEME 分析网站进行生物信息学分析。结果显示，澳洲坚果 MiMYB44L 与蒂罗花（*Telopea speciosissima*）的 TsMYB44 和荷花（*Nelumbo nucifera*）的 NnMYB44 蛋白序列相似度最高，聚为一个亚族（图 3）。含有 8 个特征的基序：1. HRAFTPEEDETIIRAHARFGNKWATIARLLSGRTDNAIKNHWNSTLKRKC；2. DRIKGPWSPEEDEALQKLVQKHGPRNWSLISKSIPGRSGKSCRLRWCNQL；3. QFFSAEFLAVMQEMIRKEVRNYMSGJEQN；4. NPSSPSGSDVSDSSLPVMSSSHVYRPVARTGGVLPPVQTIE；5. CLQAEGIRNAVVKRIGISKIE；6. DPPTSLSLSLPGSDS；7. HSQQPLKRSASAGAATPVSG；8. MASTRKDV。说明其结构与植物 MYB 44 家族蛋白序列一致。



PcMYB44. 牧豆树（XP_054775903.1）；**ApMYB44**. 相思子（XP_027359981.1）；**StMYB44**. 决明（KAF7809869.1）；**GmMYB44**. 大豆（XP_003524661.1）；**VrMYB44**. 贝达葡萄（XP_034691187.1）；**DfMYB44**. 美洲山茱萸（XP_059641739.1）；**NnMYB44**. 荷花（XP_010244270.1）；**MiMYB44L**. 澳洲坚果；**TsMYB44**. 蒂罗花（XP_043712840.1）；**CsMYB44**. 茶树（XP_028080167.1）；**ZjMYB44**. 枣（XP_015884347.2）；**CpMYB44**. 番木瓜（XP_021903563.1）；**PaMYB44**. 银白杨（XP_034897249.1）；**PvMYB44**. 阿月浑子（XP_031272387.1）；**MeMYB44**. 木薯（XP_021601648.1）；**JcMYB44**. 麻风树（NP_001295712.1）；**AtMYB44**. 拟南芥（Q9FDW1.1）；**VaMYB44**. 葡萄（OM902065）；**PsMYB44**. 牡丹（cluster_20336）。下同。

PcMYB44. *Prosopis cineraria* (XP_054775903.1); **ApMYB44**. *Abrus precatoriu*s, (XP_027359981.1); **StMYB44**. *Senna tora* (KAF7809869.1); **GmMYB44**. *Glycine max* (XP_003524661.1); **VrMYB44**. *Vitis riparia* (XP_034691187.1); **DfMYB44**. *Cornus florida* (XP_059641739.1); **NnMYB44**. *Nelumbo nucifera* (XP_010244270.1); **MiMYB44L**. *Macadamia integrifolia*; **TsMYB44**. *Telopea speciosissima* (XP_043712840.1); **CsMYB44**. *Camellia sinensis* (XP_028080167.1); **ZjMYB44**. *Ziziphus jujuba* (XP_015884347.2); **CpMYB44**. *Carica papaya*, XP_021903563.1; **PaMYB44**. *Populus alba* (XP_034897249.1); **PvMYB44**. *Pistacia vera* (XP_031272387.1); **MeMYB44**. *Manihot esculenta* (XP_021601648.1); **JcMYB44**. *Jatropha curcas* (NP_001295712.1); **AtMYB44**. *Arabidopsis thaliana* (Q9FDW1.1); **VaMYB44**. *Vitis vinifera* (OM902065); **PsMYB44**. *Paeonia suffruticosa* (cluster_20336). The same below.

图 3　MiMYB44L 与其他植物 MYB 蛋白氨基酸序列进化分析和基序分析

Fig. 3　Amino acid sequence evolutionary analysis and motif analysis of MiMYB44L and other plant MYB proteins

经过对蛋白保守结构域分析发现（图 4），MiMYB44L 与其他植物的 MYB 在功能域序列相似度高，均含有 SANT superfamily 结构域。其特征为在 8~173 氨基酸序列中含有 MDRIKGPWSPEEDDSLQKLVQKHGPRNWSLISKSIPGRSGKSCRLRWCNQLSPQVEHRAFTPEEDETIIRAHAKFGNKWATIARLLSGRTDNAIKNHWNSTLKRKCSSMvddaSDDAQAHQPLKRSNSAGAAVAPVSSLYFNSPSSPSGSDVSDSSLPVMSSSHVY 序列。Myb 超家族蛋白，具有转录、RNA 加工和修饰、细胞分裂和染色体分割等作用。SANT 结构域结合端粒 DNA 串联重复序列的串联拷贝是加帽复合体的一部分。对于包含 G/C 丰富基序[C2-3 A （CA）1-6]的重复序列，其结合是序列依赖性的。该结构域也发现于与 DNA 结合的调节性转录抑制物复合物中，在所有物种中极端保守。蛋白特性图（图 5）显示 MiMYB44L 蛋白为疏水性蛋白，不含有跨膜结构域和信号肽。主要含有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化位点。

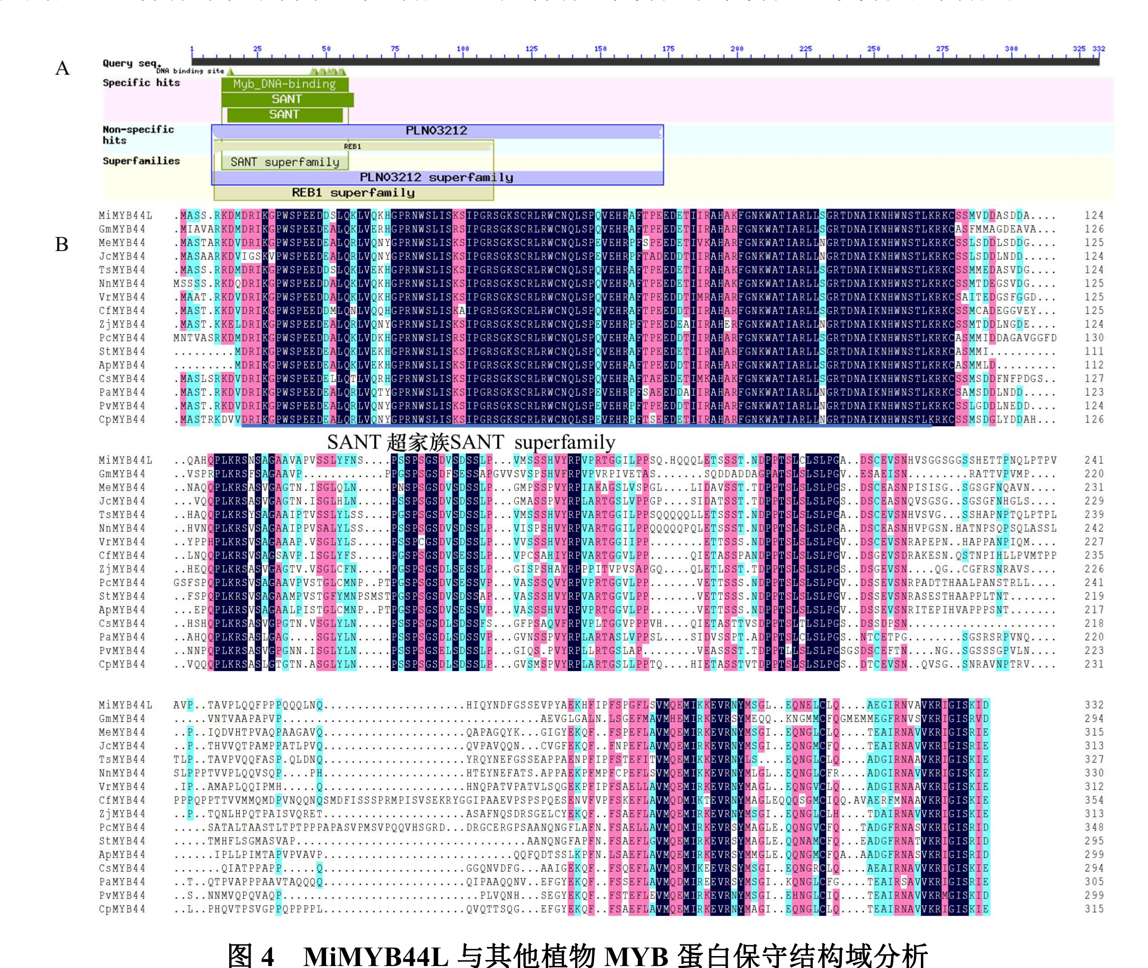
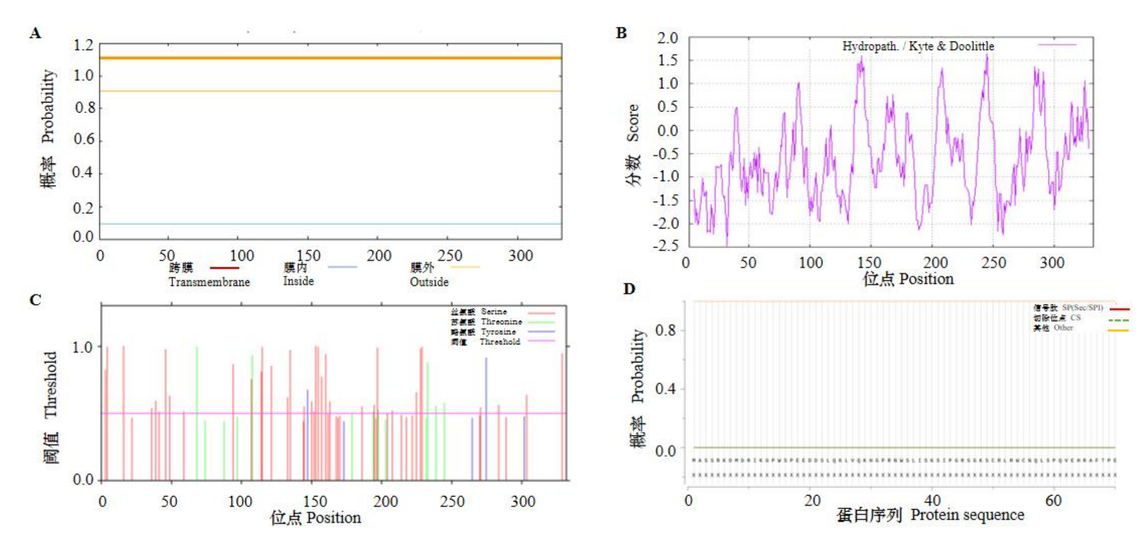


图 4 MiMYB44L 与其他植物 MYB 蛋白保守结构域分析

Fig. 4 Conservative domains analysis of MiMYB44L and other plant MYB proteins



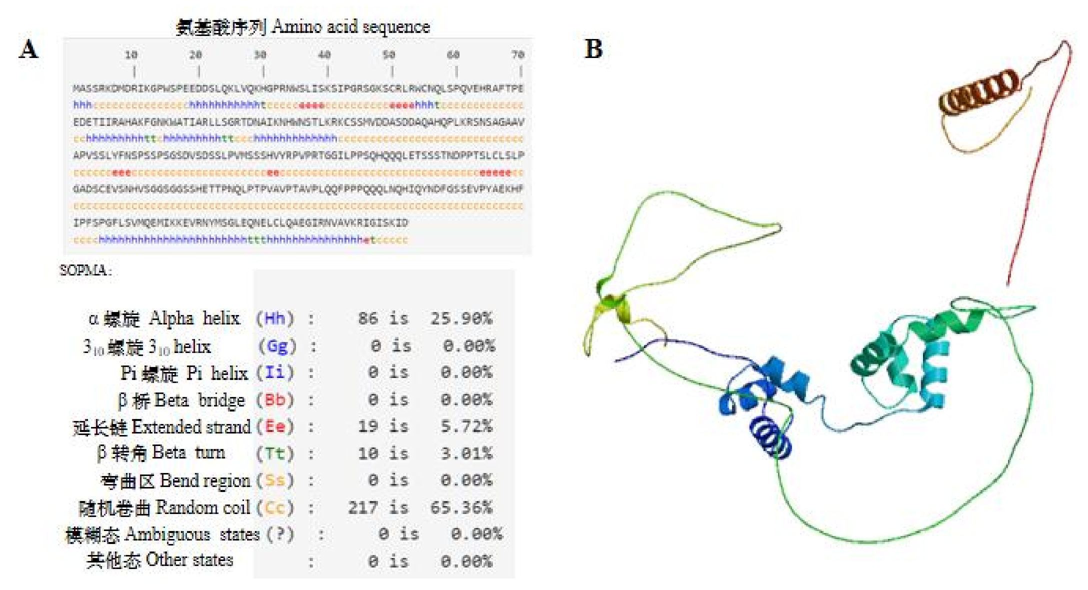
A. 跨膜分析；**B**. 亲水性分析；**C**. 磷酸化分析；**D**. 信号肽分析。

A. Transmembrane analysis; **B**. Hydrophilic analysis; **C**. Phosphorylation analysis; **D**. Signal peptide analysis.

图 5　MiMYB44L 蛋白特性分析

Fig. 5　Analysis of the MiMYB44L protein properties

在蛋白保守结构域分析的基础上，进一步分析了 MiMYB44L 的二级和三级结构。MiMYB44L 二级结构中α-螺旋为 86 氨基酸，占比 25.90%。延长链为 19 个氨基酸，占比 5.72%。β-转角 10 个氨基酸，占比 3.01%。随机卷曲 217 氨基酸，占比 65.36% （图 6）。



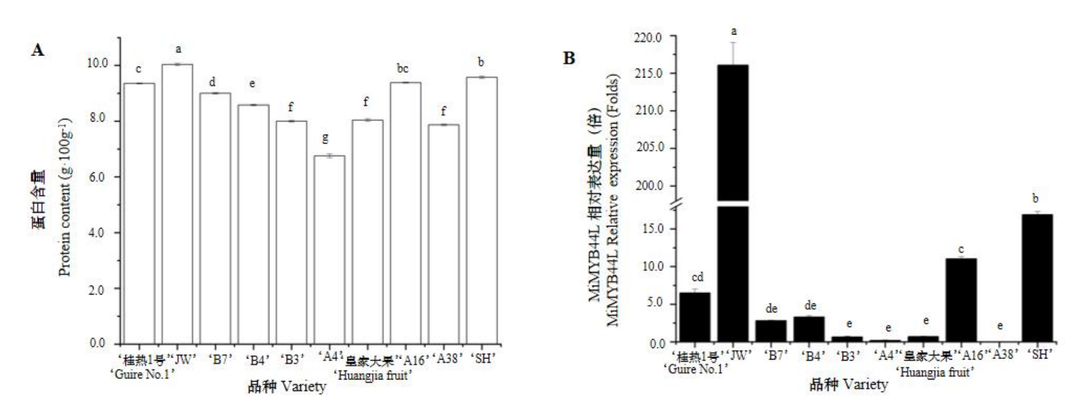
A. 二级结构分析；**B**. 三级结构模型。

A. Secondary structural analysis; **B**. Tertiary structure model.

图 6　MiMYB44L 蛋白结构分析

Fig. 6　Analysis of the MiMYB44L protein structure

分析‘桂热 1 号’，‘A38’和‘JW’等 10 个品种澳洲坚果果仁中的蛋白含量表明，蛋白含量间存在显著性差异。进一步提取 10 个品种果仁的 RNA 分析表明，MiMYB44L 在‘JW’和‘SH’等高蛋白含量品种中表达量最高，在‘A4’‘B4’等品种中表达量最低（图 7）。蛋白含量和表达量的相关系数为 0.54（*P*=0.002），达到显著水平。



各柱形图上用不同小写字母表示数据间差异显著（*P*<0.05）。

Different lowercase letters above each column means significant differences (*P*<0.05).

图 7　10 个澳洲坚果品种果仁蛋白含量和 *MiMYB*44*L* 表达分析

Fig. 7　Protein contents and *MiMYB*44*L* expression levels in kernels of ten *Macadamia* varieties

3 讨论

研究转录因子调控澳洲坚果蛋白含量的分子机制和栽培技术的报道较少，但是国内外已经开展了相关的生理与分子生物学研究。例如，在研究澳洲坚果早期花序的代谢物和内源激素含量变化规律发现，随着果实的生长，包括脂类、糖类和醇类、氨基酸、有机酸和核苷酸在内的大部分差异累积代谢物在果实中显著降低。除氨基酸外，大部分差异累积代谢物在叶轴中显著增加。与弱花序相比，强花序果实中以脂质为主进行积累。叶轴中则积累脂质、核苷酸和糖（Yang et al., 2023）。在澳洲坚果种质资源收集的基础上，也对不同品种的营养成分进行研究，发现果仁营养成分均以脂肪为主。其中，‘GR1’种质的脂肪含量最高为 78 g·100g^{-1}，‘A4’ 种质的脂肪含量最低为 69.90 g·100g^{-1}。一些果实品质性状间存在着显著相关性（谭秋锦等，2021b）。据此，推测调控澳洲坚果果实蛋白含量的因子也是调控果仁其他营养成分的因子。MYB44 就是一个多功能的转录因子，是众多植物激素信号下游的关键调控因子。最新研究表明，在拟南芥中，MYB44 通过促进 EIN2 和 MPK3/6 的表达来调控病原体相关分子模式（PAMP）触发的免疫（PTI）（Wang et al., 2023）。在拟南芥根中韧皮部移动的 MYB44 负性调节磷酸转运蛋白 1 的表达，从而调节植物对低磷胁迫的耐受（Olukayode et al., 2023）。植物激素脱落酸信号途径关键转录因子 ABI5 通过调控 MYB44 的稳定性促进热激胁迫诱导的黄瓜叶绿素降解（Liu et al., 2023）。除了在拟南芥等模式植物中发现和证明 MYB44 的新功能，在热带乔木中也相继证明了 MYB44 的多样性作用，如在橡胶树中证明HbMYB44受多种激素信号诱导（Qin et al., 2022)。在油菜中证明 BcMYB44 既能调控花青苷合成又能调控对干旱的抗性（Hao et al., 2022）。可见，MYB44 保守的结构赋予了其在不同植物中具有类似的功能。本研究中，克隆 MiMYB44L 蛋白具有保守的 SANT 结构域，与蒂罗花和荷花的 MYB44 划分为一类。分子结构分析证明了它是植物 MYB44 转录家族的成员之一。果仁中蛋白含量分析和表达分析之间具有极显著的相关性，说明 MiMYB44L 可能是澳洲坚果中蛋白含量的调控因子。

随着遗传学和分子生物学技术的进步，可引入更多和更新的研究方法鉴定其在澳洲坚果中的功能。尽管植物中暂没发现 MYB44 转录因子直接调控蛋白含量的报道，但在芥菜中，已经证明靶向沉默 BjMYB28 转录因子基因直接调控芥菜低硫代葡萄糖苷系的发育（Augustine et al., 2013）。最近，采用系统发育、共线性和生化分析相结合的方法，鉴定并研究了月桂科植物特有的柠檬醛生物合成基因簇，包含 MYB44 作为转录因子和两个乙醇脱氢酶（ADHs）作为修饰酶，它们来源于物种特异性串联和近端复制事件（Zhao et al., 2023)。牡丹 PsMYB44 氨基酸序列的 C 端有一个完整的影响花青素生物合成的 C2 基序，其聚集在

MYB44L 转录抑制分支中。PsMYB44 位于细胞核中，其时空表达模式与斑点形成呈负相关（Luan et al., 2023）。可见，可以采用进化、转基因等新技术证明 MiMYB44L 在澳洲坚果果仁营养成分合成中具有的转录调控作用。下一步，可采取进化分析方法分析不同物种中 MYB44 的进化关系并分析复制事件。提取 10 个蛋白含量显著差异品种的基因组 DNA，扩增每个品种基因组中的 *MiMYB44L* 基因全长，分析外显子和内含子结果，并与蛋白、脂肪酸等营养含量进行相关性分析。构建了带有 35s × 2pro 强启动子和 GFP 标签的 pGREEN 载体，进行烟草瞬时表达实验证明该基因的功能。在本研究的基础上，建立澳洲坚果的遗传转化体系，采用过表达和敲除 MiMYB44L 基因的方法证明其对蛋白等营养成分含量的调控，对促进澳洲坚果品质育种的发展具有重要意义。

4 结论

MiMYB44L 蛋白含有 R2R3-MYB 家族特征的 SANT 结构域，是典型的 R2R3-MYB 转录因子。*MiMYB44L* 基因在澳洲坚果高蛋白含量品种中表达水平显著高于其在低蛋白含量品种中的表达量，相关系数为 0.54，达到显著水平。

参考文献：

AUGUSTINE R, MUKHOPADHYAY A, BISHT NC, 2013. Targeted silencing of *BjMYB28* transcription factor gene directs development of low glucosinolate lines in oilseed *Brassica juncea*[J]. Plant Biotechnol J, 11 (7): 855-866.

DE SILVA AL, TRUEMAN SJ, KAMPER W, et al., 2023. Hyperspectral imaging of adaxial and abaxial leaf surfaces as a predictor of Macadamia crop nutrition[J]. Plants-Basel, 12 (3): 558.

GABRIELLI F, ANTINUCCI M, TOFANELLI S, 2022. Gene structure evolution of the short-chain dehydrogenase/reductase (sdr) family[J]. Genes, 14 (1): 110.

GISRIEL CJ, CARDONA T, BRYANT DA, BRUDVIG GW, 2022. Molecular evolution of far-red light-acclimated photosystem II[J]. Microorganisms, 10 (7): 1270.

HAO YL, WANG JJ, HU CM, et al., 2022. Regulation of BcMYB44 on anthocyanin synthesis and drought tolerance in non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino)[J]. Horticulturae, 8 (5): 351.

LIU WK, CHEN GL, HE MM, et al., 2023. ABI5 promotes heat stress-induced chlorophyll degradation by modulating the stability of MYB44 in cucumber[J]. Horticul Res, 10 (6): uhad089.

LUAN YT, CHEN ZJ, TANG YH, et al., 2023. Tree peony PsMYB44 negatively regulates petal blotch distribution by inhibiting dihydroflavonol-4-reductase gene expression[J]. Ann Bot, 131 (2): 323-334.

OLUKAYODE T, CHEN J, ZHAO Y, et al., 2023. Phloem-mobile MYB44 negatively regulates expression of phosphate transporter 1 in *Arabidopsis* roots[J]. Plants-Basel, 12 (20): 3617.

QIN B, FAN SL, YU HY, et al., 2022. HbMYB44, a rubber tree MYB transcription factor with versatile functions in modulating multiple phytohormone signaling and abiotic stress responses[J]. Front Plant Sci, 13: 893896.

RICHARDS TE, KAMPER W, TRUEMAN SJ, et al., 2020. Relationships between nut size, kernel quality, nutritional composition and levels of outcrossing in three *Macadamia* cultivars[J]. Plants-Basel, 9 (2): 228.

SONG HY, ZHANG T, HE P, et al., 2023. Cloning and expression analysis of MibZIP1 from *Macadamia integrifolia*[J]. Bull Bot Res, 43 (1): 131-139. [宋海云，张涛，贺鹏，等，2023.

澳洲坚果 MibZIP1 基因克隆及表达规律分析[J]. 植物研究，43 (1): 131-139.]

STRACKE R, WERBER M, WEISSHAAR B, 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Curr Opin Plant Biol, 4 (5): 447-456.

TAN QJ, CHEN HS, WEI YR, et al., 2021a. Nutritional analysis and evaluation of kernel of *Macadamia integrifolia*[J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 36 (2): 150-154. [谭秋锦，陈海生，韦媛荣，等，2021a. 澳洲坚果种质果仁主要营养成分分析与评价[J]. 中国粮油学报，36 (2): 150-154.]

TAN QJ, WEI YR, HUANG XY, et al., 2021b, Analysis of fruit characteristics and nutrients of 10 accessions of *Macadamia integrifolia*[J]. J Fruit Sci, 38 (5): 672-680. [谭秋锦，韦媛荣，黄锡云，等，2021b. 10 份澳洲坚果种质果实性状与营养成分分析[J]. 果树学报，38 (5): 672-680.]

WANG Z, LI X, YAO X, et al., 2023. MYB44 regulates PTI by promoting the expression of *EIN*2 and *MPK*3/6 in *Arabidopsis*[J]. Plant Commun, 4 (6): 100628.

WOJDYLO A, TURKIEWICZ IP, TKACZ K, et al., 2022. Nuts as functional foods: Variation of nutritional and phytochemical profiles and their *in vitro* bioactive properties[J]. Food Chem, 15: 100418.

XIA CX, JIANG SR, TAN QJ, et al., 2022. Chromosomal-level genome of macadamia (*Macadamia integrifolia*)[J]. Trop Plants, 1(1): 1-9.

YANG WH, LI J, XIANG FL, et al., 2023. Comparative profiling of primary metabolites and endogenous hormones in different *Macadamia* infructescences during its early development[J]. Sci Horticul, 319: 112185.

ZHANG HJ, HU YF, GU B, et al., 2022. VaMYB44 transcription factor from Chinese wild *Vitis amurensis* negatively regulates cold tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *V. vinifera*[J]. Plant Cell Rep, 41 (8): 1673-1691.

ZHAO Y, CHEN Y, GAO M, et al., 2023. Alcohol dehydrogenases regulated by a MYB44 transcription factor underlie *Lauraceae citral* biosynthesis[J]. Plant Physiol, 194 (3): 1674–1691.

ZUMAJO-CARDONA C, GABRIELI F, ANIRE J, et al., 2023. Evolutionary studies of the bHLH transcription factors belonging to MBW complex: their role in seed development[J]. Ann Bot, 132 (3): 383-400.